

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 195 03 685 A 1

⑯ Int. Cl. 6:
C 12 P 1/00
C 12 P 21/00
C 12 P 19/34
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50
G 01 N 33/68

B3

⑯ Aktenzeichen: 195 03 685.9
⑯ Anmeldetag: 30. 1. 95
⑯ Offenlegungstag: 1. 8. 96

DE 195 03 685 A 1

⑯ Anmelder:
InViTek GmbH, 13125 Berlin, DE

⑯ Erfinder:
Peters, Lars Erik, 10367 Berlin, DE; Scholoiko,
Lyubow A., Pustchino, RU; Bendzko, Peter, Dr.,
12623 Berlin, DE; Alachov, Juli B., Prof. Dr.,
Pustchino, RU

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabil Reaktionsgemische und deren Verwendung

⑯ Es wird ein Verfahren und dessen Verwendung beschrieben zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabil Reaktionsgemische für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden und gegebenenfalls Nukleinsäuren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß
a) native oder artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische mit Reaktionspuffern, Cofaktoren und Substraten anwendungsabhängig lagerstabil aufbereitet werden, wobei lediglich anwenderspezifische Schlüsselkomponenten (z. B. mRNS) für den Start der gewünschten enzymatischen Reaktion(en) fehlen, indem den Reaktionsgemischen in Lösung ein Stabilisierungsmittel zugeführt wird, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht bzw. nicht beeinträchtigt und andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt,
b) die Reaktionsgemische durch Vakuumtrocknung lagerstabil gemacht werden und dann dauerhaft ohne Aktivitätsverlust bei 4°-10°C oder gegebenenfalls unter Verwendung eines inerten Gases oder von mineralischem Öl auch bei Raumtemperatur gelagert werden können,
c) der Anwender die anwendungsgetesteten Reaktionsgemische vor dem Gebrauch lediglich durch die Zugabe des Ursprungsvolumens H₂O rekonstruiert und die gewünschte(n) enzymatische(n) Reaktion(en) durch die Zuführung des oder der anwenderspezifischen Schlüsselkomponenten startet.

DE 195 03 685 A 1

Beschreibung

5 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabilier Reaktionsgemische aus nativen und gegebenenfalls artifiziellen enzymatisch aktiven Proteingemischen, die anwendungsfertig komplettiert sind und ohne Aktivitätsverlust bei 4° – 10°C oder gegebenenfalls bei Raumtemperatur gelagert werden können, sowie die Verwendung dieser Reaktionsgemische für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden und Nukleinsäuren.

Die Verwendung von Zellextrakten und Enzymgemischen zur Untersuchung komplexer biochemischer Reaktionsabläufe spielt eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie, Biochemie und molekularen Diagnostik.

10 Die zellfreie Proteinbiosynthese mit Hilfe von Lysaten aus Weizenkeimen, Kaninchen-Retikulocyten oder Escherichia coli-Zellen ist eine Schlüsselmethode bei der Erforschung von grundlegenden Mechanismen der Synthese, Faltung und posttranslationalen Reifung von Proteinen und Polypeptiden. Probleme des intrazellulären Targetings und der Reifung von Proteinen und anderen Biomolekülen werden mit Hilfe von Mikrosomen (ER-haltige Zellfraktion), isolierten Mitochondrien, Chloroplasten oder Zellkernextrakten untersucht.

15 Neben Anwendungen aus der Grundlagenforschung gewinnen multienzymatische Zellextrakte für die Proteinbiosynthese zunehmend Bedeutung für die Lösung präparativ-synthetischer bzw. diagnostischer Zielstellungen (21; 22). Die in-vitro Translation im semipräparativen Maßstab ist ein vielversprechendes Werkzeug für die Synthese von Proteinteilstücken zur Kartierung von Epitopen, katalytischen Zentren oder artifiziellen Antigen-determinanten. Auch bei den molekularbiologischen Methoden, wie der RNS-Synthese in-vitro (7), der Polymerasekettenreaktion (PCR) (2; 5) oder DNS-Sequenzierung (20), zeichnet sich ein Trend zur Verwendung multienzymatischer Reaktionssysteme ab. Die Leistungsfähigkeit und Synthesegenaugigkeit von DNA- & RNS-Polymerasen kann durch die Kombination mit anderen Enzymen und Cofaktoren wie inorganische Pyrophosphatase, DNS-Bindungsproteine, RNase-Inhibitoren oder Exonukleasen gesteigert werden. Anspruchsvolle Anwendungen wie die Amplifikation von langen DNA-Fragmenten (> 10 kb) mit hoher Synthesegenaugigkeit (LA-PCR), ausgehend von genomischer DNA, werden erst durch die Kombination von mehreren DNS-Polymerasen mit verschiedenen Eigenschaften möglich (2; 5).

Der breiten Anwendung von komplexen multienzymatischen Reaktionssystemen sind in der angewandten Forschung und der Diagnostik noch enge Grenzen gesetzt, weil nach dem gegenwärtigen Stand der Technik Probleme der Stabilität, der einfachen Handhabung und damit der Reproduzierbarkeit nur unzureichend gelöst sind. Der entscheidende Nachteil von komplexen multienzymatischen Reaktionssystemen gegenüber Reaktionsgemischen mit Einzelenzymen besteht in ihrer komplizierten technischen Handhabung. Die kompletten Reaktionsgemische mit allen Enzymen, Substraten und Cofaktoren sind als wässrige Lösung weder bei Raumtemperatur noch bei –20°C stabil. Ein Problem, das die Stabilität von multienzymatischen Reaktionsgemischen beeinträchtigt, ergibt sich aus der Tatsache, daß die optimalen Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Art der Salze, Konzentration des Stabilisierungsmittels) für die Biosynthese meist von denen abweichen, die für die dauerhafte Konservierung der Enzymkomponenten und Cofaktoren optimal sind (10; 12; 18). Außerdem stellen die einzelnen Proteinkomponenten von Zellextrakten oder Enzymgemischen, je nachdem ob es sich um lösliche Enzyme, fibrilläre Strukturproteine, membranassoziierte Enzymkomplexe oder Nukleoproteide handelt, unterschiedliche Anforderungen an die Lagerbedingungen in Lösung. Herkömmlicherweise werden deshalb kommerzielle Reaktionssysteme für die in-vitro Transkription, Translation, PCR oder DNS-Sequenzierung in Form von Kits angeboten, in denen die Komponenten einzeln bereitgestellt werden. Im ungünstigsten Falle, wie das folgende Beispiel mit einem Reaktionsgemisch für die in-vitro Translation zeigt, müssen die verschiedenen Komponenten eines Kits nach Erhalt getrennt unter unterschiedlichen Bedingungen gelagert werden. Dem Anwender obliegt die Aufgabe, für jede Versuchsprobe den Reaktionsansatz aus einer Vielzahl von Einzelkomponenten zusammenzumischen. Dieser Vorgang ist nur schwer automatisierbar. Mit der Anzahl der Proben potenziert sich der Zeitaufwand und die Wahrscheinlichkeit von Fehlern, und dadurch wird die Reproduzierbarkeit beeinträchtigt. Oft nimmt die Vorbereitung der Reaktionsgemische mehr Zeit in Anspruch als die eigentliche Versuchsdurchführung.

50 Beispielhaft läßt sich diese Problematik anhand der Zusammensetzung der Reaktionsgemische für die in-vitro Translation mit Hilfe zellfreier Extrakte darstellen:

Ausgangskomponenten	Konz.-Faktor	Lagertemperatur
1. Mastermix (HEPES-KOH, ATP, GTP, DTT, Spermidin, Kreatinphosphat)	12.5 X	-20°C
2. Aminosäuremix (19 L-Aminosäuren, 2.5 mM)	50 X	4°C
3. Hefe-tRNS (125 mg/ml)	25 X	-70°C-85°C
4. RNase-Inhibitor	—	-20°C
5. Zellextrakt (zellfreies Lysat, DTT, K-azetat, Mg-azetat, Kreatinphosphokinase, HEPES-KOH)	3 X	-85°C

Aufgrund der verschiedenen Temperaturanforderungen von -85°C, -20°C und 4°C ist der technische Aufwand für die Lagerung und den Transport der Ausgangskomponenten des Translationsgemisches hoch. Die Komponenten 1 und 4 sind selbst bei konstant -20°C nur wenige Monate stabil und müssen dann durch frische Lösungen ersetzt werden. Die Versendung von Zellextrakten und den anderen Reaktionskomponenten in löslicher Form muß in Trockeneis erfolgen, um ein Auftauen der Probe zu vermeiden. Auch die Lagerung ist insofern nicht unproblematisch, als daß man teure Tiefgefriertruhen, die üblicherweise mit flüssigem Stickstoff betrieben werden, mit technisch aufwendigen Absicherungen und Alarmanlagen benötigt.

Der empfindlichste und zugleich wichtigste Teil von Reaktionsgemischen für die in-vitro Translation sind die Zellextrakte, weil sie alle enzymatischen Komponenten für die ribosomale Proteinbiosynthese enthalten. Der komplexe biochemische Reaktionsablauf der mRNS-gesteuerten Polypeptidsynthese erfordert die kooperative Interaktion einer Vielzahl von Enzymen, Enzymkomplexen und Strukturproteinen mit unterschiedlicher Struktur und Stabilität. Anders als in Zellen, wo die Proteine des ribosomalen Translationsapparates makromolekulare Komplexe bilden, die durch Interaktionen mit den filamentösen Komponenten des Zytoskeletts stabilisiert werden, enthalten die zellfreien translationsaktiven Extrakte kein intaktes Zytoskelett mehr. Frei in Lösung können die makromolekularen Enzymkomplexe sehr leicht dissoziieren und verlieren damit ihre Reaktionsfähigkeit. Die einzige zuverlässige Methode für die Konservierung von löslichen Zellextrakten nach dem gegenwärtigen Stand der Technik ist die Lagerung im tiefgefrorenen Zustand bei -80°-85°C. Trotzdem ist damit eine Reihe von Problemen verbunden. Beim Einfrieren verlieren die Zellextrakte aus Weizenkeimen, Retikulozyten, oder E. coli-Zellen einen Teil ihrer enzymatischen Aktivität, da durch die Bildung von Wasserkristallen viele Proteine irreversibel geschädigt werden (12). Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der zellfreien Extrakte für aufeinanderfolgende Anwendungen führt bei Präparaten aus E. coli und Kaninchen-Retikulozyten zum vollständigen Verlust ihrer Aktivität, während sich nach eigenen Untersuchungen die Translationsaktivität von Weizenkeimextrakten um 30-50% nach jedem Einfrieren und Auftauen reduziert.

Die Instabilität von zellfreien Extrakten gegenüber wiederholtem Einfrieren und Auftauen zwingt den Anwender zu einem unwirtschaftlichen Verbrauch dieser teuren Reaktionskomponente. Für reproduzierbare Versuchsergebnisse darf jede Charge des translationsaktiven Zellextraktes nur einmal aufgetaut werden. Die Aktivitätsverluste bei der Lagerung im tiefgefrorenen Zustand sind höher, wenn man anstatt des hochkonzentrierten Zellextraktes das komplette anwendungsfertige Translationsgemisch einfriert. Bereits nach einmaligem Einfrieren und einer Woche Lagerung verliert ein komplettes Reaktionsgemisch etwa 60% der enzymatischen Aktivität, gemessen an der Endausbeute des Translationsproduktes, im Vergleich zu einem Reaktionsgemisch, das frisch aus den Einzelkomponenten zusammengestellt wurde. Offenbar spielt die Proteinkonzentration, die im unverdünnten Zellextrakt 3-4 mal höher ist als im fertigen Translationsgemisch, die entscheidende Rolle für die Stabilität der multienzymatischen Komponenten während des Einfrierens und im tiefgefrorenen Zustand.

Ähnlich verhält sich die Stabilitätsproblematik bei anderen Reaktionsgemischen für die Synthese und Modifizierung von Nukleinsäuren. Selbst einmaliges Einfrieren in wässriger Lösung deaktiviert RNS- und DNS-Polymerasen vollständig, so daß sie nur unter Zuhilfenahme von Kryoprotektoren als Einzelenzymlösungen stabil bei -20°C gelagert werden können. Üblicherweise verwendet man Glyzerin in einer Konzentration von mindestens 50% als Hilfsstoff, der die Bildung von schädlichen Wasserkristallen unterbindet. Aufgrund der notwendigen hohen Konzentration von Glyzerin, oder gegebenenfalls anderer Hilfsstoffe wie Dimethylsulfoxid, Polyethylenglycol oder Rinderserumalbumin, können Kryoprotektoren nicht für die Tiefkühl Lagerung von kompletten Reaktionsgemischen eingesetzt werden (12; 6). Die Viskosität der resultierenden Lösungen beeinträchtigt die Reaktionsfähigkeit der enzymatischen Komponenten und ist ein Problem für nachfolgende Analysen des Reaktionsgemisches. Bei Konzentrationen < 50% sinkt auch die Lagerstabilität der Enzyme bei -20°C.

Überraschenderweise hat sich seit dem Erscheinen der ersten Veröffentlichungen über die zellfreie Proteinbiosynthese und posttranskriptionale Modifikation mitte der 70-iger Jahre wenig an der Technologie zur Herstellung und Konservierung von enzymatisch aktiven Zellextrakten geändert. Prinzipiell bietet sich zu dem bereits beschriebenden Stand der Technik die Alternative der Lagerstabilisierung durch Gefriertrocknung an. Diese Methode wird vor allem zur Stabilisierung von Liposomen und Membranfraktionen (6), Einzelenzympräparaten

(1; 4; 8) oder von Reaktionsgemischen ohne Enzymkomponente (16) angewendet, wobei spezielle Zucker oder andere Polyole in Kombination mit bivalenten Metallionen oder Tensiden (13; 14; 15) die Denaturierung der Enzyme bzw. der Membranstrukturen durch den Wasserverlust verhindern. Als besonders effektiv zur Stabilisierung von Biomaterialien während der Gefriertrocknung hat sich der natürliche Zucker Trehalose erwiesen (19; 9; 10). Dieser Zucker wird von einigen Organismen, den sogenannten Cryptobionten, bei extremer Trockenheit in den Zellen angereichert, und sichert so die Überlebensfähigkeit dieser Organismen bei totalem Wasser- verlust (17; 3).

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden technischen Probleme sind die Bereitstellung eines Herstellungsverfahrens, das die Nachteile des Standes der Technik bezüglich der stabilen Lagerung, des Transports sowie der anwendungsfertigen Aufbereitung von multienzymatischen Reaktionsgemischen für die Durchführung komplexer biochemischer bzw. molekularbiologischer Reaktionen vermeidet. Insbesondere soll das Verfahren auf eine Tiefkühlung der zu lagernden und zu transportierenden Proben verzichten können, sowie durch die Bereitstellung kompletter, d. h. bereits mit allen notwendigen Reaktionskomponenten versehenen Reaktionsgemische, den experimentellen Zeitaufwand für den Anwender erheblich reduzieren und die Reproduzierbarkeit erhöhen. Die Aufgabe wird erfahrungsgemäß gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 und 12. Die Unteransprüche betreffen spezielle Ausführungsformen des erfahrungsgemäßen Verfahrens.

Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich vom Stand der Technik zur Verwendung von Trehalose als Stabilisator zum ersten dadurch, daß komplettete und multienzymatische Reaktionsgemische mit vielen Protein- komponenten und nicht Einzelenzyme bzw. Reaktionsteilgemische ohne enzymatische Komponenten lagerstabil und anwendungsfertig hergestellt werden können. Zweitens wurden Bedingungen gefunden, unter denen die Trehalose ohne weitere Hilfsstoffe ausreichende Lagerstabilität gewährleistet und zusätzlich die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Reaktionsgemisches nach Rekonstituierung erhöht.

Das erfahrungsgemäße Verfahren betrifft multienzymatische Reaktionsgemische für die zellfreie Proteinbio- synthese (in-vitro Translation). Unter verschiedenen Bedingungen wurden 50 µl-Translationsgemische vakuum- getrocknet und in Wasser rekonstituiert. Die Reaktionsfähigkeit der so behandelten Reaktionsgemische wurde anhand der Translation von synthetischer Obelin-mRNA nachgewiesen. Obelin ist Lumineszenzprotein mit einem Molekulargewicht von 20 kDa. Der Nachweis des Translationsproduktes erfolgte sowohl quantitativ über die Messung der TCA-fällbaren radioaktiv markierten Proteine aus 5 µl des Translationsgemisches, als auch qualitativ über die elektrophoretische Analyse im SDS-PAGE mit anschließender Radioautographie, nach 2 Stunden Inkubation bei 25°C. Es zeigte sich, daß die Proteinkomponenten des translationsaktiven Zellextraktes während des Trocknungsprozesses vollständig denaturieren, unabhängig davon, ob sie vorher tiefgefroren wurden oder nicht. Die Proteine lösten sich nicht mehr aus dem lyophilisierten Rückstand in Wasser auf und verblieben als trüber Niederschlag im Reaktionsgemisch. Ein radioaktiv markiertes Translationsprodukt (Obelin) ließ sich nicht nachweisen (Abb. 1/A, Spur 4 und 8), obwohl die TCA-fällbare radioaktiv markierte Proteine nachgewiesen werden konnten (Abb. 1/B). Dieser Effekt beruhte auf der unspezifischen Bildung des zur radioaktiven Markierung verwendeten [³⁵S]-L-Methionin an die denaturierten Proteine.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß bereits geringe Trehalosekonzentrationen (2,5% und 5%) ohne weitere Zusatzstoffe im Translationsgemisch ausreichen, die empfindlichen enzymatischen Komponenten des zellfreien Weizenkeimextraktes zumindest teilweise vor der Denaturierung während der Vakuumtrocknung und Rekonstituierung zu schützen (Abb. 1/A & 1/B). Der beste Effekt konnte mit einer Trehaloseendkonzentration von 10% erzielt werden. Etwa 84% der ursprünglichen Translationsaktivität, gemessen an der Syntheseausbeute, konnten im Vergleich zur Kontrollreaktion mit einem frisch angesetzten Reaktionsgemisch ohne Trehalose nach Lyophilisation und Rekonstituierung erhalten werden. Interessanterweise ergab sich aus den ersten Experimenten, daß der Stabilisierungseffekt der Trehalose nicht proportional mit der Konzentration im Translationsgemisch korreliert.

In 25 µl-, 50 µl- und 100 µl-Reaktionsgemischen mit 10% Trehalose, die entweder lyophilisiert oder einfach vakuumgetrocknet wurden, wurde die Kinetik der Obelintranslation nach der Rekonstituierung in Wasser bestimmt und mit der Synthesekinetik in der Kontrollreaktion verglichen. Als Kontrollreaktion diente jeweils ein frisch angesetztes Translationsgemisch ohne Trehalose mit gleichem Reaktionsvolumen. Zur Bestimmung der Translationskinetik von Obelin wurden in bestimmten Zeitabständen 3 µl-Proben dem Translationsgemisch entnommen und darin die TCA-fällbare radioaktiv markierte Proteinfaktion quantifiziert (in cpm). Es zeigte sich, daß bei den 25 µl-Reaktionsansätzen die Kinetiken der Obelinsynthese in den unterschiedlich behandelten Translationsgemischen nicht signifikant voneinander bzw. von der Kinetik der Kontrollreaktion abwichen (Abb. 2). Das heißt mit anderen Worten, daß 25 µl-Translationsgemische ohne Verlust ihrer ursprünglichen Reaktionsfähigkeit lagerstabil durch Vakuumtrocknung gemacht bzw. rekonstituiert werden können, wobei es keine Rolle spielt ob sie vorher in einem Alkohol/Trockeneisbad schockgefroren werden.

Im Gegensatz dazu beeinflußten bei 50 µl- und 100 µl-Translationsgemischen die Bedingungen der Lagerstabilmachung die Effektivität der Konservierung der Translationsaktivität (Abb. 3/A & 3/B).

Die Unterschiede sind sowohl im Verlauf der Kinetiken als auch in der Differenz der der Syntheseausbeute des radioaktiv markierten Translationsproduktes nach 2 Stunden Inkubation zu erkennen. Bei der Lagerstabilmachung der 50 µl- Reaktionsgemische durch einfache Vakuumtrocknung (2,5 Stunden) gingen etwa 40% der ursprünglichen Translationsaktivität im Vergleich zur Kontrollreaktion verloren. Ein Einfrieren der Proben bei -50°C vor der Vakuumtrocknung (Lyophilisation) vermindert drastisch den Aktivitätsverlust der 50 µl-Translationsgemische während des Trocknungsprozesses. Die Translationsaktivität der rekonstituierten lyophilisierten Reaktionsgemische beträgt nahezu 100% im Vergleich zur Kontrollreaktion in einem frischen Translationsgemisch ohne Trehalose. Ähnlich verhält es sich mit den 100 µl-Translationsgemischen (Abb. 3/B).

Überraschenderweise stimulierte die Trehalose in der gleichen Konzentration, die auch die beste Konservie-

rung der Reaktionsfähigkeit während der Lagerstabilmachung und Rekonstituierung gewährleistet, die in-vitro Translation in unbehandelten frisch an gesetzten 50 µl- und 100 µl-Reaktionsgemischen (Abb. 3/A & 3/B). Die Syntheseausbeuten lagen etwa um 10—20% höher als in den entsprechenden Kontrollreaktionen ohne Trehalose. Ein positiver Effekt von Trehalose auf die ribosomale Proteinbiosynthese war bisher unbekannt. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Erhöhung der Translationsaktivität von zellfreien Extrakten durch Trehalose besonders relevant, da dadurch der Aktivitätsverlust von 10—20% (vergleiche die entsprechenden Kinetiken in Abb. 3/A & 3/B), der auch bei Lyophilisation der Translationsgemische eintritt, wieder ausgeglichen wird. So zeigen die rekonstituierten lagerstabilen Reaktionsgemische die gleiche Translationsaktivität wie die nach dem Stand der Technik aus Einzelkomponenten frisch zusammengestellten Translationsgemische ohne Trehalose.

Ein entscheidender Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Lagerstabilität der lyophilisierten anwendungsfertigen Reaktionsgemische. Es wurden mehrere komplette 100 µl-Translationsgemische unter Zugabe von 10% Trehalose lyophilisiert, dann luftdicht verschlossen und 1 bzw. 2 Wochen bei 4°—8°C im normalen Kühlschrank, bzw. bei Raumtemperatur (25°C) aufbewahrt. Danach wurden die lyophilisierten Reaktionsgemische wieder in Wasser rekonstituiert, die Kinetik der Obelintranslation bestimmt und mit Translationskinetik in einem frischen Reaktionsgemisch verglichen (Abb. 4). Die Ergebnisse demonstrieren, daß die Translationsaktivität der lagerstabil gemachten Reaktionsgemische nicht durch die Lagerung bei 4—8°C beeinträchtigt werden. Die Lagerung der lyophilisierten Translationsgemische bei RT führte allerdings zu einem starken Abfall der Reaktionsfähigkeit. Die Ursache dafür besteht darin, daß die hygroskopischen Azetat-Salze aus dem Translationspuffer nicht in die amorphe Glasmasse der Trehalose eingeschlossen werden, sondern sich als flockiger Rückstand darüber ablagern. Dieser Rückstand zieht das Wasser aus der darüber liegenden Luftsäule an, so daß das getrocknete Translationsgemisch durchfeuchtet wird. Ein zu hoher Wassergehalt und eine Lagertemperatur > 10°C setzt enzymatische Abbauprozesse in Gang, die instabile Substrate wie ATP und GTP und auch empfindliche enzymatische Komponenten deaktivieren. Dadurch verloren die getrockneten Translationsgemische bereits nach einer Woche Lagerzeit bei Raumtemperatur bis zu 70% ihrer Ausgangsaktivität. Dieser Aktivitätsverlust konnte nicht durch Zugabe von frischem ATP und GTP bei der Rekonstitution des Translationsgemisches ausgeglichen werden. Erfindungsgemäß kann dieses Problem gelöst werden, indem die lyophilisierten Reaktionsgemische mit einem inertem Gas überschichtet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht so die anwendungsfertige Aufbereitung von nativen und artifiziellen enzymatisch aktiven Proteingemischen mit Reaktionspuffern, Cofaktoren und Substraten in dem:

- den Reaktionsgemischen in wässriger Lösung ein Stabilisierungsmittel, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems erhöht bzw. nicht beeinträchtigt und andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologischen Struktur während der Lagerstabilmachung Lagerung schützt,
- ggf. nach Einfrieren
- diese vakuumgetrocknet werden,
- ggf. eine Überschichtung mit inertem Gas oder mineralischem Öl erfolgt.

Die so erhaltenen lagerstabilen Reaktionsgemische werden erfindungsgemäß nach Rekonstituierung in Wasser durch Zuführung von anwenderspezifischen Schlüsselkomponenten je nach gewünschter enzymatischer Reaktion für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden oder ggf. Nukleinsäuren eingesetzt.

Die erfindungsgemäß hergestellten komplexen multienzymatischen Reaktionsgemische haben den Vorteil, daß sie bei 0—10°C oder ggf. nach Überschichtung mit einem inertem Gas bei Umgebungstemperatur (20—30°C) stabil gelagert und transportiert werden können. Dadurch entfällt der technisch und finanziell hohe Aufwand für die Anschaffung und Unterhaltung einer Tiefkühlrausstattung, wie sie nach dem herkömmlichen Stand der Technik notwendig ist. Ihr zweiter entscheidender Vorteil besteht darin, daß sie anwendungsfertig mit allen notwendigen Reaktionskomponenten aufbereitet sind, so daß der Anwender die gewünschte Reaktion nur durch die Zugabe einer, maximal von zwei, Schlüsselkomponenten starten kann. Das ermöglicht die Umgehung der Nachteile des Standes der Technik bezüglich:

- der simultane Durchführung einer großen Zahl von Parallelversuchen,
- einer hohen Reproduzierbarkeit der enzymatischen Reaktionen,
- eines minimalen Zeitaufwand zur Versuchsvorbereitung,
- der Vermeidung von Fehlern bei Komposition von Reaktionsgemischen aus vielen Komponenten,
- der Automatisierung komplexer biochemischer multienzymatischer Reaktionsabläufe.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Beispiel näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiel

1. Herstellung eines translationsaktiven Reaktionsgemisches auf der Basis eines Weizenkeimlysats unter Verwendung des Stabilisierungsmittels Trehalose

1.1 Herstellung eines anwendungsfertigen lagerstabilen Translationsgemisches aus Einzelkomponenten

Auf einem Eisbad bei 0°—4°C wird das anwendungsfertige Translationsgemisch in einem 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aus folgenden Einzelkomponenten zusammenpipettiert:

a) 4 μ l Mastermix, bestehend aus 312 mM HEPES-KOH pH 7.6, 12.5 mM ATP, 1.25 mM GTP, 100 mM Kreatinphosphat, 3.12 mM und 25 mM DTT;
 b) 2 μ l Aminosäuremix, bestehend aus 2.5 mM von 19 natürlichen L-Aminosäuren ohne L-Methionin (Alternativ dazu kann auch L-Leucin oder L-Lysin fehlen, je nachdem welche der Aminosäuren zur Markierung des Translationsproduktes eingesetzt wird);
 c) 16 μ l Translationspuffer, bestehend aus 120 mM K-azetat, 5 mM Mg-azetat und 30 Gew.-% Trehalose;
 d) 3 μ l RNase-freies Wasser (Millipore-18 M Ω);
 e) 2 μ l Kreatinphosphokinase-Lösung (1.125 mg/ml);
 f) 2 μ l Hefe-tRNS (125 mg/ml);
 g) 2 μ l RNSse-Inhibitor (40–200 U);
 h) 16 μ l Weizenkeimextrakt, bestehend aus Weizenkeimlysat mit einer Konzentration von 90 A₂₈₀/ml, 40 mM HEPES-KOH pH 7.6, 120 mM K-azetat, 5 mM Mg-azetat und 6 mM DTT.

Das Endvolumen des fertigen Translationsgemisches beträgt 50 μ l. Für die Herstellung von 25 bzw. 100 μ l Translationsgemischen müssen die Volumina der Ausgangskomponenten proportional verkleinert oder vergrößert werden.

1.2 Lagerstabilmachung der Translationsgemische

Die Komponenten der Translationsgemische werden vorsichtig im Reaktionsgefäß durchmischt und durch eine Impulszentrifugation am Boden des Gefäßes gesammelt. Unmittelbar danach werden die Reaktionsgefäße mit den Translationsgemischen bei geöffnetem Deckel in einem Alkohol/Trockeneisbad (–50°C) schockgefroren. Nach einer weiteren Minute werden die Reaktionsgefäße in eine Zentrifuge mit angeschlossener Vakumpumpe und Kühlfalle (SpeedVac oder vergleichbare Geräte) übertragen und bei konstant 30°Cvakuumgetrocknet. Translationsgemische mit einem Endvolumen \leq 30 μ l werden ohne vorheriges Schockfrieren vakuumgetrocknet. Die Zentrifugation während der Vakuumtrocknung sorgt dafür, daß sich die enzymatischen und nichtenzymatischen Komponenten des Translationsgemisches am Boden des Reaktionsgefäßes sammeln und tropfenförmig in die glasartige Masse der Trehalose versintert werden.

Nach 2.5 bis 3 Stunden wird der Trocknungsprozeß beendet, indem man die Vakuumzentrifuge vorsichtig belüftet. Der Lufteinlaß an der Zentrifuge ist mit einem Sterilfilter zu versehen, um die Kontamination der getrockneten Translationsgemische mit mikrobiellen Keimen zu verhindern. Die Reaktionsgefäße mit den eingetrockneten Translationsgemischen werden unter sterilen Bedingungen aus der Zentrifuge entfernt und unmittelbar danach luftdicht verschlossen.

In diesem Zustand werden die getrockneten Translationsgemische bei 0°C–10°C im Kühlschrank stabil gelagert werden. Zur Lagerung bei Temperaturen zwischen 20°–30°C werden die getrockneten Reaktionsgemische mit Stickstoff oder einem anderem inertem Gas, unmittelbar nachdem die noch offenen Reaktionsgefäße aus der Vakuumzentrifuge entnommen wurden, überschichtet.

1.3 Rekonstituierung der vakuumgetrockneten Translationsgemische und Durchführung der in-vitro Translation

Vor der Durchführung der in-vitro Translation werden die vakuumgetrockneten Reaktionsgemische mit Wasser in Lösung gebracht. Zunächst werden die vakuumgetrockneten Translationsgemische auf Eis gestellt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Reaktionsvolumen werden genau definierte Volumen Wasser auf die vakuumgetrockneten Rückstände pipettiert. Für einen 50 μ l-Translationsansatz entspricht das einem Volumen von 32 μ l, für 25 μ l- und 100 μ l-Translationsansätze entsprechend 16 μ l und 64 μ l. Durch vorsichtiges Mischen wird der glasartige Trehalosetropfen mit den Reaktionskomponenten vollständig aufgelöst. Während der Auflösung sollten die Translationsgemische von Zeit zu Zeit immer wieder auf Eis gestellt werden, um sie kühl zu halten. Insgesamt nimmt die Überführung der lagerstabilen Translationsgemische in Lösung nicht mehr als 5 Minuten ein.

Die Translationsreaktion wird durch die Zugabe von 4 μ l (1 μ g/ μ l) mRNS-Lösung, bzw. entsprechend 2 oder 8 μ l mRNS-Lösung für die Reaktionsvolumina 25 und 100 μ l, und 1 μ l bzw. 0.5 oder 2 μ l [³⁵S]L-Methionin 1000 Ci/mmol gestartet. Die angegebenen Mengen der mRNS beziehen sich auf das im Fallbeispiel translatierte Lumineszenz-enzym Obelin. Für andere Proteine muß die optimale mRNS-Menge jeweils empirisch in Titrationsversuchsreihen im Bereich von 1–10 μ g für einen 50 μ l Translationsansatz bestimmt werden, wobei aber das Volumen der zugegebenen RNS-Lösung konstant bleiben muß. Nach der Zugabe der mRNS und der radioaktiv-markierten Aminosäure werden die Translationsgemische kurz durchmischt, durch eine Impulszentrifugation am Boden des Gefäßes gesammelt, und dann bei 25°C in einem Thermostat inkubiert. Nach 0, 15, 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten werden jeweils 2 μ l-Proben den Reaktionsgemischen entnommen, auf Filterscheiben aus Whatman 3 MM-Chromatographiepapier aufgetropft und an der Luft getrocknet. Der Nachweis des radioaktiv markierten Translationsproduktes Obelin erfolgt auf herkömmliche Weise durch eine Trichloressigsäurefällung der Proben auf dem Filterpapier und anschließender Waschung der gefällten Proben in eisgekühlter 5% Trichloressigsäure und Aceton. Zur Bestimmung der säurefällbaren Radioaktivität (in cpm) als Maß für die Menge des synthetisierten Translationsproduktes werden dann die Filterscheiben mit den behandelten Proben in 3 ml eines entsprechenden Scintillationsgemisches getaucht und auf einem entsprechenden Scintillationscounter vermessen. Die Entnahme von Proben aus dem Translationsgemisch zu verschiedenen Zeitpunkten ermöglicht die Bestimmung der Kinetik des Translationsprozesses. Alternativ dazu kann der Nachweis des Translationsproduktes auch qualitativ durchgeführt werden, indem die Proben auf einem 12% SDS-PAGE aufgetrennt und das markierte Translationsprodukt anschließend durch direkte Radioautographie mit einem Röntgenfilm

nachgewiesen wird.

Translationsgemische ohne Trehalose für die Kontrollreaktion zum Nachweis des Einflusses des Stabilisierungsmittels auf die Translationsaktivität und Lagerstabilität der Translationsgemische werden entsprechend dem obigen Schema angesetzt, allerdings unter Verwendung eines Translationspuffers (Komponente c) ohne Trehalose.

5

Literatur

1. Argall, M.E., Smith, G.D. (1993) The use of trehalose-stabilized lyophilized methanol dehydrogenase from *Hyphomicrobium X* for the detection of methanol. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 30 (3), 491–497. 10
2. Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12), 2216–2220.
3. Burke, M.J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological Systems. *Membranes, Metabolism, and Dry Organisms*, A.C. Leopold Ed. (Cornell University Press, Ithaca, NY), 3358–363.
4. Carpenter, J.F., Crowe, L.M., Crowe, J.H. (1987) Stabilization of phosphofuctokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta* 923 (1), 109–115. 15
5. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12), 5695–5699.
6. Crowe, L.M. and J.H. Crowe (1992) Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. *Dev. Biol. Stand.* 74, 20 285–294.
7. Cunningham, P.R., Ofengand, J. (1990) Use of inorganic pyrophosphatase to improve the yield of in vitro transcription reactions catalyzed by T7 RNA polymerase. *Biotechniques* 9 (6), 713–714.
8. Ford, A.W. and P.S. Dawson (1993) The effect of carbohydrate additives in the freezedrying of alkaline phosphatase. *J. Pharm. Pharmacol.* 45 (2), 86–93. 25
9. Franks, F. (1991) Freeze-drying: from empiricism to predictability. *Cryo-Lett.* 11, 93–110.
10. Franks, F. (1989) Improved freeze-drying: analysis of the basic scientific principles. *Process Biochem.* 24 (1), R3–R7.
11. Franks, F. and R.H.M. Hartley (1990) Storage of materials. European Patent Application No. 038 569.
12. Gekko, K. and S.N. Timasheff (1981) Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry* 20, 4667–4686. 30
13. Goodnough, M.C. and E.A. Johnson (1992) Stabilization of botulinum toxin type A during lyophilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (10), 3426–3428.
14. Hazen, K.C., Bourgeois, L.D., Carpenter, J.F. (1988) Cryoprotection of antibody by organic solutes and organic solute/divalent cation mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* 267 (1), 363–371. 35
15. Hora, M.S., Rana, R.K., Smith, F.W. (1992) Lyophilized formulations of recombinant tumor necrosis factor. *Pharm. Res.* 9 (1), 33–36.
16. Kaijalainen, S., Karhunen, P.J., Lalu, K., Lindstrom, K. (1993) An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose. *Nucl. Acid Res.* 21 (12), 2959–2960. 40
17. Mackenzie, K.F., Singh, K.K., Brown, A.D. (1988) Water stress plating hypersensitivity of yeasts: protective role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 134 (6), 1661–1666.
18. Privalov, P.L. (1987) Protein stability and hydrophobic interactions. *Biophysika* 32 (5), 742–760.
19. Roser, B. (1991) Trehalose drying a novel replacement for freeze-drying. *BioPham* 4 (8), 47–53.
20. Tabor, S. and C.C. Richardson (1990) DNA sequence analysis with modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.* 265 (14), 8322–8328. 45
21. Spirin, A.S. (1992) Gene expression in cell-free systems on a preparative scale. *Bioorg. Khim.* 18 (10–11), 1394–1402.
22. Volyanik, E.V. et al. (1993) Synthesis of preparative amounts of biological active interleukin-6 using a continuous-flow cell-free translation system. *Anal. Biochem.* 214 (1), 289–294. 50

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung komplexer multienzymatischer lagerstabiler Reaktionsgemische, dadurch gekennzeichnet, daß native oder artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische mit Reaktionskomponenten und einem Stabilisierungsmittel, welches einerseits die Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Systems nicht beeinträchtigt und gegebenenfalls erhöht und welches andererseits die instabilen Reaktionskomponenten vor dem Verlust ihrer biologischen Aktivität bzw. ihrer biologisch aktiven Struktur während der Lagerstabilmachung und Lagerung schützt, in wässriger Lösung kombiniert werden, gegebenenfalls eingefroren, durch Vakuumtrocknung und anschließend gegebenenfalls Überschichtung mit einem inertem Gas oder mineralischem Öl in einen bei 0°–10°C bzw. 20°–30°C lagerstabilen Zustand überführt werden, wobei die Menge des Stabilisierungsmittels zur Erhöhung der Reaktionsfähigkeit des multienzymatischen Reaktionsgemisches äquivalent zu der Menge ist, die für die Lagerstabilmachung des komplexen multienzymatischen Reaktionsgemisches benötigt wird. 55
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als native enzymatisch aktive Proteingemische Zelleextrakte oder Fraktionen aus diesen einsetzt. 60
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als artifizielle enzymatisch aktive Proteingemische ein Mischung aus vorgereinigten Einzelenzymen, Cofaktoren und gegebenenfalls Strukturprotei- 65

5 nen einsetzt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reaktionskomponenten enzymatische und nichtenzymatische Cofaktoren, Enzymsubstrate, Nukleotide und Nukleoside oder deren Oligomere, Proteine, Peptide, Thiolverbindingen, RNS, DNS und gegebenenfalls Derivate jeder der obigen Substanzen einzeln oder in Kombination einsetzt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Stabilisierungsmittel ein chemisch inerter Zucker oder gegebenenfalls ein Zuckergemisch ist, der oder das im getrockneten Zustand eine amorphe Glasmasse mit einem Restwassergehalt von nicht mehr als 0.2 g H₂O/g Trockenmasse bildet.

6. Verfahren nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des Stabilisierungsmittels in dem anwendungsfertigen Reaktionsgemisch in wäßriger Lösung nicht weniger als 5 Gew.-% und nicht mehr als 10 Gew.-% beträgt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Stabilisierungsmittel Trehalose ist.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakuumtrocknung in einer handelsüblichen Vakuumzentrifuge (z. B. SpeedVac) bei 30°C bis zu einem Restwassergehalt von 0.2 g H₂O/g, mindestens aber 2,5 Stunden, durchgeführt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktionsgemische mit einem Volumen \geq 30 µl vor der Vakuumtrocknung bei -50°C in einem Alkohol/Trockeneisbad oder gegebenenfalls in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren werden.

10. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß Reaktionsgemische mit einem Volumen < 30 µl direkt aus der Lösung vakuumgetrocknet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als inerte Gase Stickstoff, Helium oder Argon eingesetzt werden.

12. Verwendung der komplexen multienzymatischen lagerstabilen Reaktionsgemische nach Anspruch 1 bis 11 für die Synthese, Modifizierung oder Analyse von Polypeptiden oder Nukleinsäuren nach Rekonstitution in Wasser, wobei jeweils eine oder mehrere spezifische Schlüsselkomponenten hinzugegeben werden.

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schlüsselkomponenten radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierte Aminosäuren oder deren entsprechende aminoacyl-transfer RNS-Moleküle, radioaktiv- bzw. nichtradioaktiv-markierte Nukleotide oder gegebenenfalls deren Derivate oder Oligomere, natürliche oder artifizielle Boten-RNS, DNS verschiedenen Ursprungs oder Kombinationen aus den obigen Substanzen sind.

14. Verwendung nach Anspruch 12 und 13 für die zellfreie ribosomale Proteinbiosynthese und gegebenenfalls für die posttranskriptionale Modifikation von Peptiden, Polypeptiden und Proteinen.

15. Verwendung nach Anspruch 12 und 13 für die Replikation, reverse oder nichtreverse Transkription, gegebenenfalls Anreicherung oder Modifizierung von Nukleinsäuren.

35

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

Abb. 1A Reaktionsfähigkeit der Translationsgemische nach Lagerstabilmachung und Rekonstituierung in Abhängigkeit von der Trehalosekonzentration

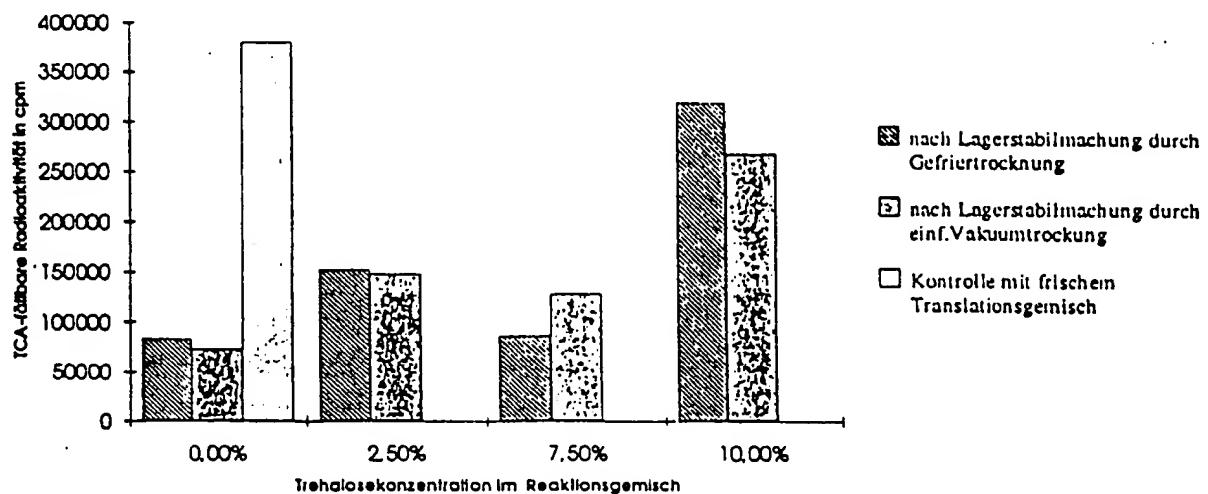


Abb. 1/B: Obelin-Translation in rekonstituierten Reaktionsgemischen bei verschiedenen Trehalosekonzentrationen

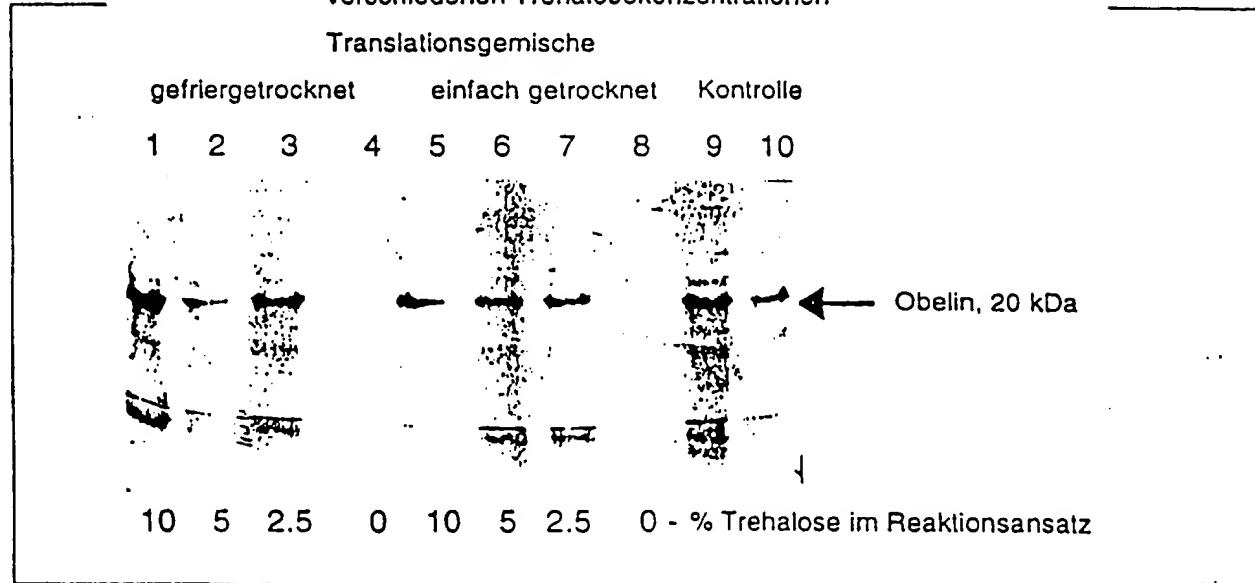


Abb. 2: Kinetiken der Oberlintranslation in rekonstituierten 25 μ l-Translationsgemischen mit 10% Trehalose

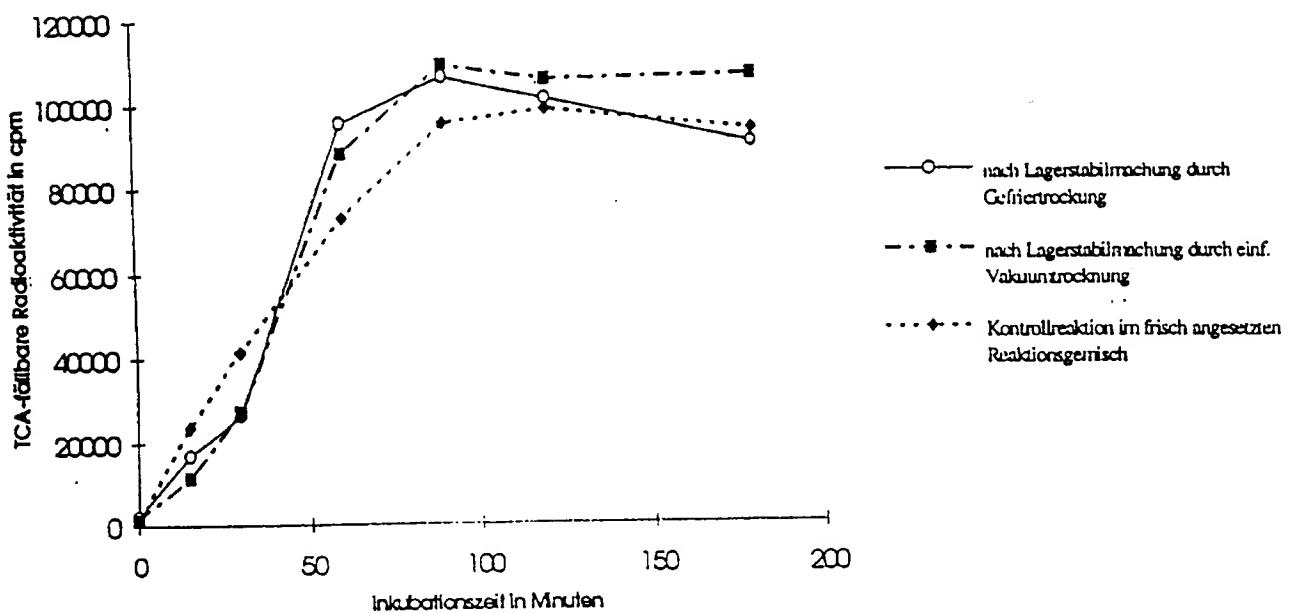


Abb. 3/A: Kinetiken der Obelltranslati on in rekons tituierten und frischen 50 μ l-Translati onen gemis chen - Einfluß der Gefriertrocknung

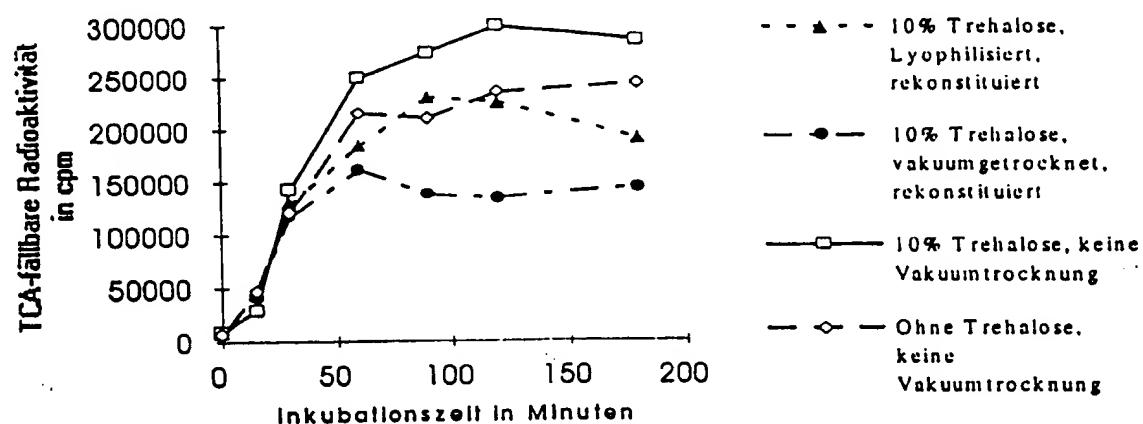


Abb. 3/B: Kinetiken der Obelltranslati on in rekons tituierten und frischen 100 μ l-Translati onen gemis chen

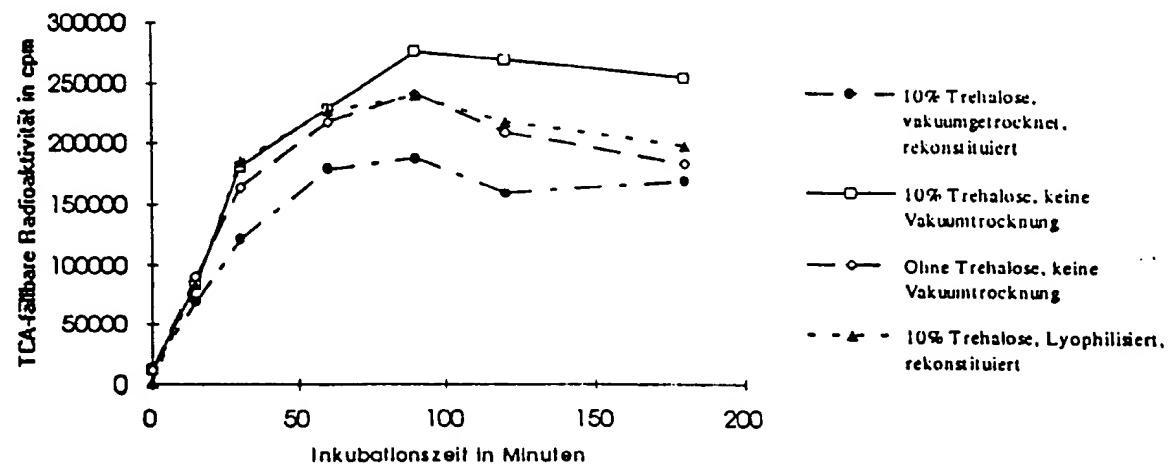
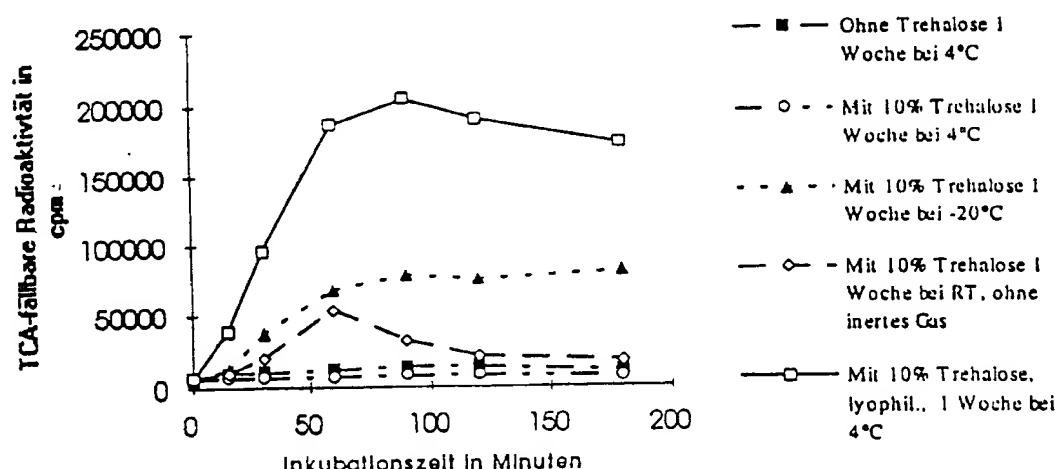


Abb. 4: Lagerstabilität von 50 μ l-Translationsgemischen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung, Lagerstabilmachung und Lagerbedingungen



71 Applicant

InViTek GmbH, 13125 Berlin, DE

72. Inventors:

Peters, Lars Erik, 10376 Berlin,
DE; Scholoiiko, Lyubow A,
Putschino RU; Bendzko Peter Dr
12623 Berlin, DE; Alachov, Juli B,
Prof. Dr., Putschino RU

5

54. Method of producing complex multi-enzymatic storage-stable reaction

10 mixtures and use thereof.

57. A method, and its application, is described for producing complex multi-enzymatic storage-stable reaction mixtures for the synthesis, modification or analysis of polypeptides and, if required, nucleic acids, which is characterised in
15 that

a) native or artificial enzymatically active protein mixtures are prepared with reaction buffers, cofactors and substrates so as to be ready to use and storage-stable, whereby only user-specific key components (e.g. mRNA) for initiating the required enzymatic reaction(s) are missing, with a stabilising agent being added
20 to the reaction mixtures in solution which on the one hand increases the reactivity of the multi-enzymatic or does not impair it, and on the other hand protects the unstable reaction components against the loss of their biological activity or their biologically active structure during storage stabilisation and storage,

25 b) the reaction mixtures are storage-stabilised through vacuum-drying and can then undergo long-term storage at 4°-10°C or, if necessary, at room temperature with the use of an inert gas or mineral oil, without loss of activity,

c) the user simply reconstructs the ready-to-use reaction mixtures before use by adding the original volume of H₂O and starts the required enzymatic reaction(s) by adding the user-specific key component(s).

30

The following details have been taken from the documents submitted by the applicant.

Description

The subject matter of the invention is a method of producing complex multi-enzymatic storage-stable reaction mixtures of native and, if necessary, artificial enzymatically active protein mixtures, which are produced to be ready to use and can be stored at 4°-10°C or, if necessary, at room temperature without loss of activity, as well as the use of these reaction mixtures for the synthesis, modification or analysis of polypeptides and nucleic acids.

10 The use of cell extracts and enzyme mixtures for the study of complex biochemical reaction courses plays a central role in molecular biology, biochemistry and molecular diagnostics.

15 Cell-free protein biosynthesis with the aid of lysates of wheatgerm, rabbit reticulocytes or Escherichia coli cells is a key method in research into the fundamental mechanisms of the synthesis, folding and post-translational maturing of proteins and polypeptides. Problems of intracellular targeting and maturing of proteins and other biomolecules are investigated with the aid of microsomes (cell fractions containing ER), isolated mitochondria, chloroplasts or nuclear extracts.

20 In addition to applications from basic research, multi-enzymatic cell extracts for protein biosynthesis are becoming increasingly important for the solution of preparative-synthetic and/or diagnostic objectives (21;22). In-vitro translation on a semi-preparative scale is a promising tool for the synthesis of protein fractions for charting epitopes, catalytic centres or artificial antigen determinants. In the molecular biological methods too, such as RNA synthesis in-vitro (7), the polymerase chain reaction (PCR) (;5) or DNA sequencing (20) there is a clear trend towards the use of multi-enzymatic reaction systems. The performance and synthesis accuracy of DNA & RNA polymerases can be improved through

25 combination with other enzymes and cofactors such as inorganic pyrophosphatase, DNA binding proteins, RNase inhibitors or exonucleases.

30 Sophisticated applications such as the amplification of long DNA fragments (> 10

kb) with a high synthesis accuracy (LA-PCR) starting from genomic DNA, only become possible through the combination of several DNA polymerases with various properties (2;5).

5 There are still narrow bounds imposed on the broad application of complex multi-enzymatic reaction systems in applied research and diagnostics, as with the current state of the art problems of stability, ease of use and thus reproducibility are not solved in a satisfactory manner. The key disadvantage of complex multi-enzymatic reaction systems compared to reaction mixtures with single enzymes

10 consists in their complex technical handling. As an aqueous solution, the complete reaction mixtures with all the enzymes, substrates and cofactors are not stable at either room temperature or at -20°C. One problem which negatively affects the stability of multi-enzymatic mixtures arises from the fact that the optimum reaction conditions (pH value, ion

15 strength, type of salts, concentration of the stabilising agent) for the biosynthesis usually differ from those which are optimal for the long-term preservation of the enzyme components and cofactors (10;12;18). Furthermore the individual protein components of cell extracts or enzyme mixtures, depending on whether they are soluble enzymes, fibrillar structural proteins, membrane-associated enzyme

20 complexes or nucleoproteins, make differing demands on the storage conditions in solution. Conventionally therefore, commercial reaction systems for the in-vitro transcription, translation, PCR or DNA sequencing are supplied in the form of kits in which the components are prepared individually. In the worst case, as shown in the following example with a reaction mixture for in-vitro translation, the various

25 components of a kit have, on receipt, to be stored separately and in different conditions. The user has the task of mixing together the reaction preparation from a number of individual components for each test sample. This process can only be automated with difficulty. The time consumption and probability of errors increase exponentially with regard to the number of samples thereby impairing

30 the reproducibility. Often the preparation of the reaction mixtures takes up more time than the actual experiment.

By way of example this problem can be illustrated using the composition of the reaction mixtures for in-vitro translation with the aid of cell-free extracts.

Initial components	Conc. factor	Storage temp.
1. Mastermix (HEPES-KOH, ATP, GTP, DTT, Spermidine, creatinine phosphate)	12.5X	-20°C
2. Amino acid mix (19 L-amino acids, 2.5 mM)	50 X	4°C
3. Yeast tRNA (125 mg/ml)	25 X	-70°-85°C
4. RNase inhibitor	-	-20°C
5. Cell extract (cell-free lysate, DTT, K-acetate, Mg acetate, creatinine phosphokinase, HEPES- KOH)	3 X	-85°C

5 Because of the different temperature requirements of -85°C, -20°C and 4°C, the technical cost of storage and transport of the initial components of the translation mixture is high. Components 1 and 4 are only stable for a few months even at a constant -20°C and then have to be replaced with new solutions. The transportation of cell extracts and the other reaction components in soluble form has to take place in dry ice in order to prevent the sample from thawing out.

10 Storage too is not without its problems if expensive freezers, which are usually operated with liquid nitrogen and have technical safeguards and alarm systems, are required.

15 The most sensitive and at the same time most important part of reaction mixtures for in-vitro translation are the cell extracts as they contain all the enzymatic components for ribosomal protein biosynthesis. The complex course of reaction of mRNA-controlled polypeptide synthesis requires the co-operative interaction of a number of enzymes, enzyme complexes and structural proteins of different structures and stabilities. In contrast to cells where the proteins of the ribosomal translation apparatus form macromolecular complexes which are stabilised through interactions with the filament components of the cytoskeleton, cell-free translation-active extracts no longer contain intact cytoskeleton. Being free in

20

solution the macromolecular enzyme complexes can very easily disassociate and thereby lose their susceptibility to reaction. The only reliable method of preserving soluble cell extracts in accordance with the current state of the art is storage in a deep-frozen state at -80-85°C. Nevertheless a number of problems are

5 associated with this. During freezing the cell extracts from wheatgerm, reticulocytes or E. coli cells lose part of their enzymatic activity as through the formation of water crystals many proteins are irreversibly damaged (12). Repeated freezing and thawing of the cell-free extracts for consecutive applications results in the complete loss of activity in preparations of E. coli and 10 rabbit reticulocytes, while according to some studies the translation activity of wheatgerm extracts is reduced by 30-50% each time they are frozen and thawed out.

15 The instability of cell-free extracts vis-à-vis repeated freezing and thawing out forces the user to use these costly reaction components uneconomically. For reproducible test results each batch of translation-active cell extract may only be thawed out once. The activity losses during storage in a deep-frozen state are higher if instead of the highly-concentrated cell extract the complete ready-to-use 20 translation mixture is frozen. Even after being frozen once and stored for one week a reaction mixture loses around 60% of its enzymatic activity measured against the final yield of translation product, compared with a reaction mixture which is freshly put together from the individual components. Evidently the protein concentration, which in undiluted cell extract is 3-4 times greater than in the finished translation mixture, plays the decisive role in the stability of the multi- 25 enzymatic components during freezing and in the deep-frozen state.

30 The problem of stability in the case of other reaction mixtures for the synthesis and modification of nucleic acids is similar. Even freezing once in aqueous solution deactivates RNA and DNA polymerases completely so that they can only be stored in a stable condition at -20°C as single-enzyme solutions with aid of cryoprotectors. Generally glycerine in a concentration of 50% is used as an auxiliary agent to prevent the formation of damaging water crystals. Because of

the necessary high concentrations of glycerine, or possibly other auxiliary agents such are dimethyl-sulphoxide, polyethylene glycol or cattle serum albumin, cryoprotectors cannot be used for the deep-frozen storage of complete reaction mixtures (12;6). The viscosity of the resulting solutions impairs the reactivity of the enzymatic components and presents a problem for subsequent analysis of the reaction mixtures. At concentrations of <50% the storage stability of the enzymes at -20°C also decreases.

Surprisingly little has changed in the technology of producing and preserving enzymatically-active cell extracts since the appearance of the first publications on cell-free protein biosynthesis and post-translational modification in the mid-1970s. In principle the alternative to the already described state of the art is storage stabilisation through deep-freezing. This method is mainly used for the stabilisation of liposomes and membrane fractions (6), single-enzyme preparations (1;4;8) or reaction mixtures without enzyme components (16), whereby special sugars or other polyols in combination with bivalent metal ions or tensides (13;14;15) prevent the denaturation of the enzymes or membrane structures through the loss of water. The natural sugar trehalose has proven to be particularly effective in stabilising biomaterials during freeze-drying (19;9;10). This sugar is accumulated by some organisms, so-called cryptobionts, in the cell during periods of extreme dryness, thereby ensuring that these organisms survive with a total loss of water (17;3).

The problems on which the present invention is based are the provision of a production method which avoids the drawbacks of the state of the art in terms of the stable storage, transportation as well as the ready-to-use preparation of multi-enzymatic reaction mixtures for carrying out complex biochemical and/or molecular biological reactions. More particularly the method is intended to dispense with the deep-freezing of the samples to be stored and transported, as well as, by providing complete reaction mixtures, i.e. reaction mixtures containing all the necessary reaction mixtures, to reduce the user's time expenditure considerably and to increase reproducibility. The task is solved by a method

having the features of claims 1 and 12. The subclaims relate to special embodiments of the method in accordance with the invention.

The present invention differs from the state of the art in the use of trehalose as 5 stabiliser firstly in that complete and multi-enzymatic reaction mixtures with many protein components and not single enzymes or reaction component mixtures can be produced to be storage-stable and ready to use. Secondly conditions have been found under which the trehalose guarantees adequate storage stability without further auxiliary agents and also increases the reactivity of the multi- 10 enzymatic reaction mixture after reconstitution.

The method according to the invention relates to multi-enzymatic reaction mixtures for cell-free protein biosynthesis (in-vitro translation). 50µl translation mixtures were vacuum-dried and reconstituted in water under various conditions. 15 The reactivity of reaction mixtures treated in such a way was determined by way of the translation of synthetic obeline-mRNA. Obeline is luminescence protein with a molecular weight of 20 kDa. Detection of the translation product took place both quantitatively via the measurement of TCA-precipitable radioactively marked proteins from 5µl of the translation mixture, as well as qualitatively through 20 electrophoretic analysis in SDS-PAGE with subsequent radioautography after 2 hours of incubation at 25°C. It was shown that the protein components of the translation-active cell extract completely denaturise during the drying process, irrespective of whether they were previously frozen or not. The proteins no longer dissolved in water from the lyophilised residue and remained as a cloudy 25 precipitate in the reaction mixture. A radioactively-marked translation product (obeline) could not be detected (fig. 1/A, trace 4 and 8) although the TCA-precipitable marked proteins could be detected (fig. 1/B). This effect is due to the non-specific binding of the [³⁵S]L-methionine used for radioactive marking to the denaturised proteins.

30 Surprisingly it was found that even small concentrations of trehalose (2.5% and 5%) without additional auxiliary substances in the translation mixture were

sufficient to protect the sensitive enzymatic components of the cell-free wheatgerm extract at least partially from denaturisation during vacuum drying and reconstitution (figs. 1/A & 1/B). The best effect was achieved with a final trehalose concentration of 10%. Around 84% of the original translation effect, measured against the synthesis yield, was able to be obtained compared with the control reaction with a freshly prepared reaction mixture without trehalose after lyophilisation and reconstitution. Interestingly in the first experiments it was shown that the stabilisation effect of trehalose does not correlate proportionally with the concentration in the translation mixture.

In 25 μ l, 50 μ l and 100 μ l reaction mixtures with 10% trehalose which were either lyophilised or simply vacuum-dried, the kinetics of the obeline translation after reconstitution in water were determined and compared with the synthesis kinetics in the control reaction. A freshly prepared translation mixture without trehalose of the same volume was used as the control reaction in each case. To determine the translation kinetics of obeline, 3 μ l samples were taken from the translation mixture at certain intervals and the TCA-precipitable radioactively marked protein fraction quantified therein (in cpm). It was shown that in the 25 μ l reaction preparations the kinetics of obeline synthesis in the differently treated translation mixtures did not differ significantly from each other and from the kinetics of the control reaction (fig. 2). In other words this means that 25 μ l translation mixtures can be made storage-stable through vacuum drying and/or reconstituted without loss of their original reactivity, irrespective of whether they are previously shock-frozen in an alcohol/dry ice bath or not..

In contrast to this, in the case of 50 μ l and 100 μ l translation mixtures the conditions of storage stabilisation influence the effectiveness of preservation of the translation activity (figs 3/A & 3/B).

The differences are detected both in the course of the kinetics as well as in the difference in the synthesis yield of radioactively marked translation product after 2 hours of incubation. In the storage stabilisation of the 50 μ l reaction mixture

through simple vacuum drying (2.5 hours) around 40% of the original translation activity was lost in comparison with the control reaction. Freezing the samples at -50°C before vacuum drying (lyophilisation) drastically reduces the activity loss of the 50µl translation mixtures during the drying process. The translation activity of the reconstituted lyophilised reaction mixtures is almost 100% compared with the control reaction in a fresh translation mixture without trehalose. It is similar with the 100µl translation mixtures (fig. 3/B).

Surprisingly, trehalose in the same concentration which also guarantees the best preservation of the reactivity during storage stabilisation and reconstitution stimulates the in-vitro translation in untreated freshly prepared 50µl and 100µl reaction mixtures (fig. 3/A & 3/B). The synthesis yields were around 10-20% higher than in the corresponding control reactions without trehalose. A positive effect of trehalose on the ribosomal protein biosynthesis has hitherto been unknown. For the method in accordance with the invention, the increase in the translation activity of cell-free extracts through trehalose is particularly relevant as through this the 10-20% activity loss (cf. the corresponding kinetics in figs. 3/A & 3/B), which also occurs in the lyophilisation of the translation mixtures, is balanced out again. The reconstituted storage-stable reaction mixtures therefore exhibit the same translation activity as state of the art translation mixtures without trehalose freshly prepared from individual components.

A decisive advantage of the method according to the invention is the storage stability of the lyophilised ready-to-use reaction mixtures. Several complete 100 µl translation mixtures with the addition of 10% trehalose were lyophilised, then sealed in an air-tight manner and stored for 1 or 2 weeks at 4°-8°C in a normal refrigerator or at room temperature (25°C). The lyophilised reaction mixtures were reconstituted in water, the kinetics of obeline translation determined and compared with the translation kinetics in a fresh reaction mixture (fig. 4). The results demonstrate that the translation activity of the storage-stabilised reaction mixtures is not impaired by storage at 4°-8°C. However, storage of the lyophilised translation mixtures at room temperature led to a sharp reduction in the reactivity.

The reason for this is that the hygroscopic acetate salts from the translation buffer are not enclosed in the amorphous vitreous mass of the trehalose but are deposited above it as a flocculent residue. This residue absorbs the water from the column of air above it so that the dried translation mixed is moistened. Too 5 high a water content and a storage temperature of >10°C initiate enzymatic breakdown processes which deactivate unstable substrates such as ATP and GRP as well as sensitive enzymatic components. In this way the dried translation mixtures lost up to 70% of their initial activity after being stored for one week at room temperature. This loss of activity could not be compensated by the addition 10 of fresh ATP and GTP during the reconstitution of the translation mixture. In accordance with the invention this problem can be overcome by covering the lyophilised reaction mixtures with a layer of inert gas.

15 The method according to the invention thus allows the ready-to-use preparation of native and artificial enzymatically-active protein mixtures with reaction buffers, cofactors and substrates in that:

20 - a stabilising agent [is added] to the reaction mixtures which on the one hand increases or does not impair the reactivity of the multi-enzymatic system, and on the other hand protects the unstable reaction components against the loss or their biological activity or biological structure during storage stabilisation,
- if necessary after freezing
- they are vacuum dried
- and, if necessary, covering with a layer or inert gas of mineral oil takes place.

25 In accordance with the invention the thus obtained reaction mixtures are, after reconstitution in water and with the addition of user-specific key components depending on the required enzymatic reaction, used for the synthesis, modification or analysis of polypeptides or, if required, nucleic acids.

30 The complete multi-enzymatic reaction mixtures produced in accordance with the invention have the advantage that they can be stored and transported in a stable

manner at 0-10°C or, after covering with a layer of an inert gas, at ambient temperature (20-30°C). This dispenses with the high technical and financial cost of acquiring and maintaining deep-freeze equipment as is necessary in the case of the conventional state of the art. Its second decisive advantage consists in the fact that they are prepared to be ready to use with all the necessary reaction components so that the user can initiate the required reaction simply by the addition of one, or a maximum of two, key components. This avoids the drawbacks of the state of the art in relation to:

- 10 - the simultaneous implementation of a large number of parallel tests,
- high reproducibility of the enzymatic reactions,
- minimum time expended on preparing the tests,
- avoiding errors in the composition of reaction mixtures consisting of several components
- 15 - the automation of complex biochemical multi-enzymatic reaction processes.

The invention will be described in more detail below with an aid of an example.

Example of Embodiment

- 20 1. Production of a translation-active reaction mixture based on a wheatgerm lysate using the stabilising agent trehalose
- 1.1. Production of a ready-to-use storage-stable translation mixture consisting of individual components

The ready-to-use translation mixture is pipetted together from the following individual components in a 1.5 ml Eppendorf reaction vessel on a ice bath at 0-4°C:

- 30 a) 4 µl mastermix comprising 312 mM HEPES-KOH pH 7.6, 12.5 mM ATP, 1.25 mM GTP, 100 mM creatinine phosphate, 3.12 mM DDT;

b) 2 μ l amino acid mix comprising 2.5 mM of 19 natural L-amino acids or L-methionine (alternatively L-leucine or L-lysine can be omitted depending on which of the amino acids is used for marking the translation product);

5 c) 16 μ l translation buffer, comprising 120 mM K-acetate, 5 mM Mg-acetate and 30 % by weight trehalose;

d) 3 μ l RNase-free water (Millipore-18 M Ω)

e) 2 μ l creatinine phosphokinase solution (1.125 mg/ml)

f) 2 μ l yeast-tRNA (1.125 mg/ml)

10 g) 2 μ l RNA inhibitor (240-200 U)

h) 16 μ l wheatgerm extract comprising wheatgerm lysate with a concentration of 90 A₂₈₀/40 ml, HEPES-KOH pH 7.6, 120 mM K-acetate, 5 mM Mg-acetate and 6 mM DTT.

15 The final volume of the complete translation mixture is 50 μ l. For the production of 25 and 100 μ l translation mixtures the volumes of the initial components are reduced or increase proportionally.

1.2 Storage-stabilisation of the translation mixture

20 The components of the translation mixture are carefully mixed in the reaction vessel and collected on the base of the vessel by pulse centrifuging. Immediately afterwards the reaction vessels with the translation mixtures are shock-frozen in an alcohol/dry ice bath (-50°C) with the lid open. After a further minute the reaction vessels are transferred into a centrifuge with connected vacuum pump and cold trap (SpeedVac or equivalent devices) and vacuum-dried at a constant 25 30°C. Translation mixtures with a final volume of \leq 30 μ l are vacuum-dried without prior shock-freezing. Centrifuging during vacuum drying ensures that the enzymatic and non-enzymatic components of the translation mixture collect on the base of the reaction vessel and are fused in droplet-form into the vitreous 30 mass of the trehalose.

After 2.5 to 3 hours the drying process is ended by carefully ventilating the vacuum centrifuge. The air inlet into the centrifuge must be provided with a sterile filter in order to prevent contamination of the dried reaction mixture with microbial germs. The reaction vessels with the dried translation mixtures are removed from the centrifuge under sterile conditions and immediately afterwards sealed in an air-tight manner,

In this state the dried translation mixtures will be stably stored in a refrigerator at 0°C-10°C. For storage at temperatures between 20° and 30°C the dried reaction mixtures are covered with a layer of nitrogen or another inert gas immediately after the still open reaction vessels are removed from the vacuum centrifuge.

1.3 Reconstitution of the vacuum-dried translation mixture and implementation of the in-vitro translation

Before carrying out the in-vitro translation the vacuum-dried reaction mixtures are dissolved in water. First of all the vacuum-dried translation mixtures are placed on ice. Depending on the reaction volume involved precisely defined volumes of water are pipetted onto the vacuum-dried residue. For a 50 µl translation preparation this corresponds to a volume of 32 µl, and for 25 µl and 100 µl translation preparations, volumes of 16 µl and 64 µl respectively. By way of careful mixing the vitreous trehalose drop is completely dissolved with the reaction components. During dissolution the translation mixtures should repeatedly be placed on ice in order to keep them cool. In total the dissolution of the storage-stable translation mixtures does not take more than 5 minutes.

The translation reaction is started by adding 4 µl (1 µg/µl) mRNA solution or 2 or 8 µl mRNA solution respectively for the 25 and 100 µl volumes, and 1 µl or 0.5 or 2 µl [³⁵S]L-methionine 1000 Ci/mmol. The indicated quantities of mRNA relate to luminescence enzyme obeline translation in this case example. For other proteins the optimum mRNA quantity must in each case be determined empirically in

titration tests between 1-10 µg for a 50 µl translation preparation, whereby, however, the volume of the added RNA solution must remain constant. After adding the mRNA and the radioactively-marked amino acid, the translation mixtures are briefly mixed, collected on the base of the vessel by pulse 5 centrifuging, and then incubated at 25°C in a thermostat. After 0, 15, 30 , 60, 90, 120 and 180 minutes 2 µl samples are taken from the reaction mixture each time, dripped onto filter disks consisting of Whatman 3 MM chromatography paper and dried in air. Detection of the radioactively-marked translation product obeline 10 takes place in a conventional manner through trichloroacetic acid precipitation of the samples on the filter paper and subsequent rinsing of the precipitated samples in ice-cooled 5% trichloroacetic acid and acetone. To determine the acid-precipitable radioactivity (in cpm) as a measure of the quantity of the synthesised translation product the filter disks with the treated samples are the immersed in 3 ml of corresponding scintillation mixture and measured on a corresponding 15 scintillation counter. The taking of samples from the translation mixture at various time intervals allows the kinetics of the translation process to be determined. Alternatively, detection of the translation product can also be carried out qualitatively by separating the samples on a 12% SDS-PAG and then detecting the marked translation product by direct radioautography with an X-ray film.

20 Translation mixtures without trehalose for the control reaction for determining the influence of the stabilising agent on the translation activity and storage-stability of the translation mixtures are prepared in accordance with the above, but using a translation buffer (component c) without trehalose.

Claims

1. Method of producing complex multi-enzymatic storage-stable reaction mixtures, characterised in that native or artificial enzymatic active protein mixtures are combined in aqueous solution with reaction components and a stabilising agent, which on the one does not impair the reactivity of the multi-enzymatic system and, if required, increases it, and on the other hand protects the unstable reaction components against the loss of their biological activity or their biologically active structure during storage stabilisation, are frozen if necessary, and brought into a storage stable condition at 0°-10°C or 20° - 30°C by vacuum drying and then if necessary covering with a layer of an inert gas or mineral oil, whereby the quantity of stabilising agent for increasing the reactivity of the multi-enzymatic reaction mixture is equivalent to the quantity required for the storage stabilisation of the complex multi-enzymatic reaction mixture.
- 15 2. Method according to claim 1, characterised in that cell extracts or fractions thereof are used as native enzymatically active protein mixtures.
- 20 3. Method according to claim 1, characterised in that a mixture of prepurified individual enzymes, cofactors and, if necessary, structural proteins are used as artificial enzymatically active protein mixtures.
- 25 4. Method according to claim 1, characterised in that as reaction components enzymatic and non-enzymatic cofactors, enzyme substrates, nucleotides and nucleosides or their oligomers, proteins, peptides, thiol compounds, RNA, DNA and if necessary derivatives of all of the above substances are used individually or in combination.
- 30 5. Method according to claim 1, characterised in that the stabilising agent is a chemically inert sugar or, if necessary, a sugar mixture, which in a dry state forms an amorphous vitreous mass with a residual water content of no more than 0.2 g H₂/g of dry matter.

6. Method according to claims 1 and 5, characterised in that the concentration of stabilising agent in the ready-to-use reaction mixtures in aqueous solution is no less than 5% by weight and no more than 10% by weight.

5

7. Method according to claims 1, 5 and 6, characterised in that the stabilising agent is trehalose.

10 8. Method according to claim 1, characterised in that the vacuum-drying is carried out in a commercially available vacuum centrifuge (e.g. SpeedVac) at 30°C up to a residual water content of 0.2 g H₂O/g for at least 2.5 hours.

15 9. Method according to claim 1, characterised in that reaction mixtures with a volume of $\geq 30 \mu\text{l}$ before vacuum drying at -50°C are frozen in an alcohol/dry ice bath or if necessary in liquid nitrogen at -80°C.

10. Method according to claims 1 and 8, characterised in that reaction mixtures with a volume of $< 30 \mu\text{l}$ are vacuum-dried directly from the solution.

20 11. Method according to claim 1, characterised in that nitrogen, helium or argon are used as inert gases.

25 12. Use of the complex multi-enzymatic storage-stable reaction mixtures in accordance with claims 1 to 11 for the synthesis, modification or analysis of polypeptides or nucleic acids after reconstitution in water, whereby one or more specific key components are added in each case.

30 13. Use according to claim 12, characterised in that the key components are radioactively or non-radioactively marked amino acids or aminoacyl-transfer RNA molecules corresponding thereto, radioactively or non-radioactively marked nucleotides or if necessary their derivatives or oligomers, natural or artificial

messenger RNA, DNA of various origins or combinations of the above substances.

14. Use according to claims 12 and 13 for the cell-free ribosomal protein biosynthesis and, if necessary, for the post-translational modification of peptides, polypeptides and proteins.

15. Use according to claims 12 and 13 for the replication, reverse or non-reverse transcription, if necessary enrichment or modification of nucleic acids.

10

4 pages of drawings attached.

Fig. 1/A: Reactivity of the translation mixtures after storage stabilisation and reconstitution as a function of the trehalose concentration

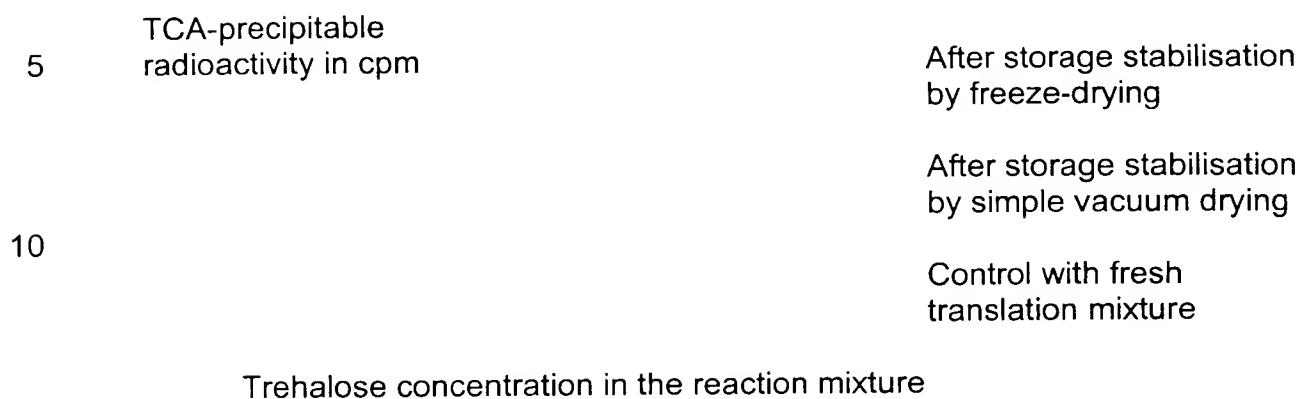


Fig. 1/B Obeline translation in reconstituted reaction mixtures at various trehalose concentrations

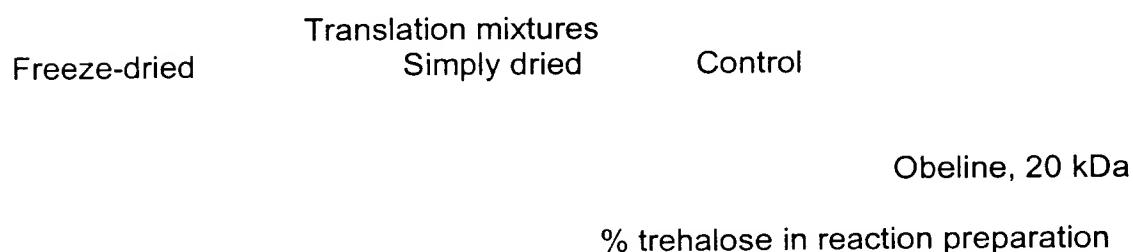


Fig. 2: Kinetics of obeline translation in reconstituted 25 μ l translation mixtures with 10% trehalose

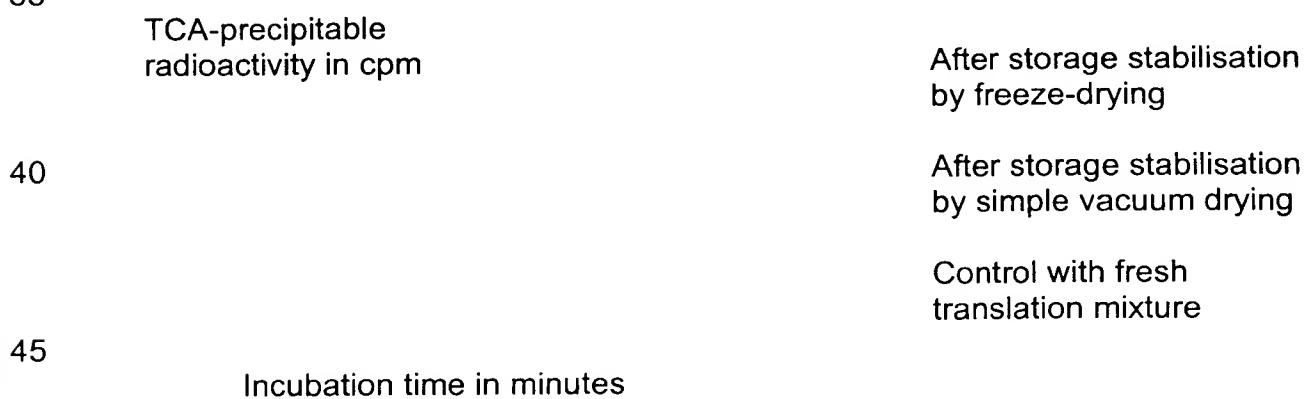


Fig. 3/A: Kinetics of obeline translation in reconstituted and fresh 50 μ l translation mixtures - influence of freeze-drying

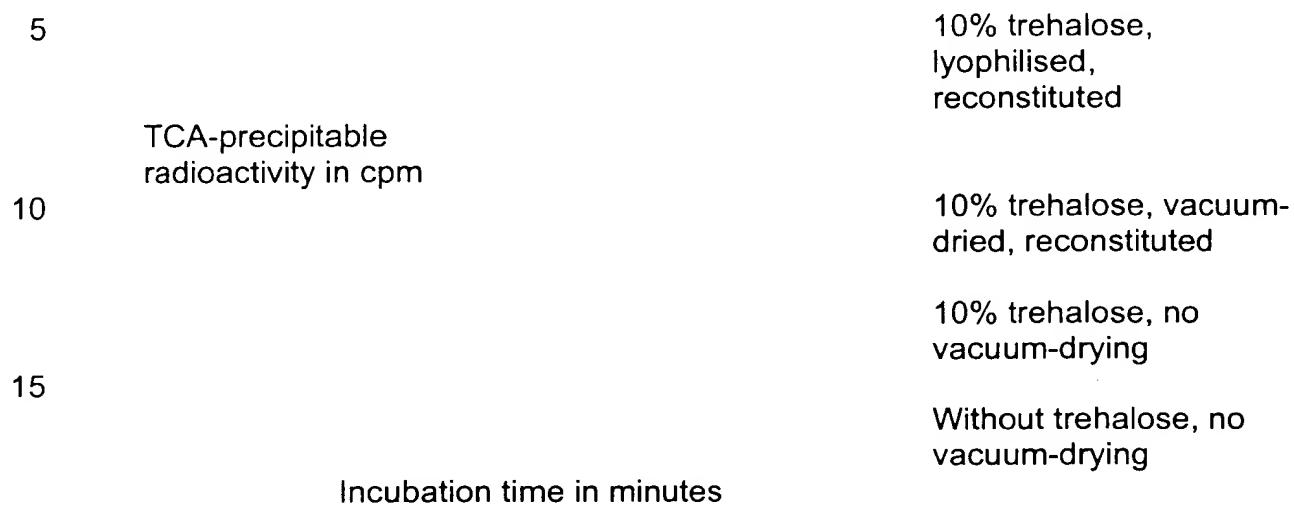


Fig. 3/B: Kinetics of obeline translation in reconstituted and fresh 100 μ l translation mixtures

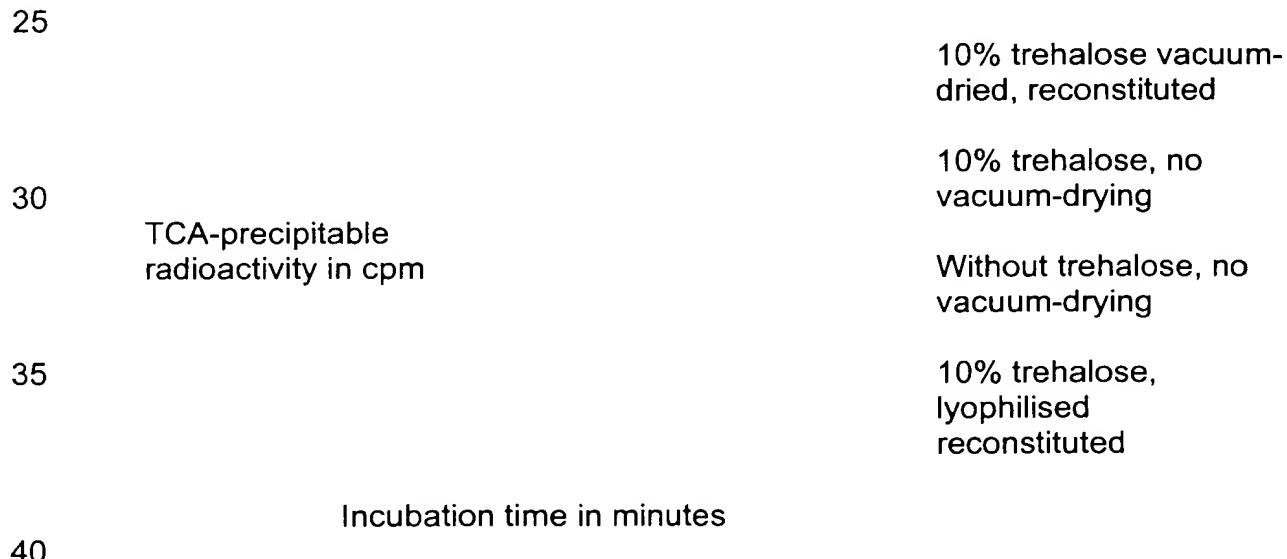


Fig. 4: Storage stability of 50 μ l translation mixtures as a function of the composition, storage stabilisation and storage conditions

